

抗がん剤耐性ABCトランスポーターに対する新規モジュレーターの同定と抗がん剤感受性への影響

著者	杉沢 徳彦
号	87
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3761号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00124173

氏名	すぎさわ のりひこ 杉沢 徳彦
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 27 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	抗がん剤耐性 ABC トランスポーターに対する新規モジュレーター の同定と抗がん剤感受性への影響
論文審査委員	主査 教授 海野 倫明 教授 千葉 奈津子 教授 富岡 佳久

論文内容要旨

がん治療において化学療法は主要な治療法であるが、多剤耐性を獲得したがん細胞への治療は課題のひとつとなっている。多剤耐性に関わる様々なメカニズムがこれまでに報告されており、その中でも特に重要なメカニズムとして、細胞膜で抗がん剤排出に関わる ABC (ATP binding cassettes; ATP 結合カセット) トランスポーターが知られている。ヒトには 48 種類の ABC トランスポーターが存在し、多剤耐性に関与するものとしてこれまでに最もよく研究されているのが ABCB1 である。この ABCB1 に対するモジュレーターは、がん細胞からの抗がん剤の排出を阻害し、抗がん剤の感受性を増強させると考えられているが、臨床で有効なモジュレーターは未だ存在しない。東北大学薬学研究科では約 5800 種類の化合物を有する独自のライブラリーを管理しており、ハイスループットスクリーニングシステムを利用した効率的な化合物のスクリーニングが可能である。そこで本研究では、この化合物ライブラリーを用いて ABCB1 に対する新規モジュレーターを開発することを目的とした。はじめに、化合物ライブラリーから提供された 5861 種類の化合物に対して、マイクロプレートリーダーを用いたハイスループットスクリーニングを行った。ABCB1 を過剰発現した細胞株の KB-V1 に対して蛍光基質のカルセイン AM を投与する際、ABCB1 を阻害する化合物を用いることで蛍光強度が上昇する。このカルセイン AM 排出試験により、13 種類の候補化合物を選択し得た。続いて、この 13 種類の候補化合物についてフローサイトメトリーの手法を用いた検討を加えた。フローサイトメトリーでは細胞単位での蛍光強度を測定することが可能である。細胞株に KB-V1 を用い、カルセイン AM 投与による蛍光強度を測定したところ、2 種類の化合物で特に強い蛍光強度の上昇を認めた。この 2 種類の化合物はいずれもイソキノリン誘導体 (イソキノリン 1、イソキノリン 2) であり、特にイソキノリン 2 を用いて、抗がん剤感受性への効果を検証した。KB-V1 に対して、ABCB1 の基質である抗がん剤 (パクリタキセル、ビンブラスチン、ドセタキセル) をこのイソキノリン 2 と同時に投与することで、いずれの抗がん剤の感受性も増強した。さらに生化学的解析を加えると、イソキノリン 2 は、ABCB1 に関連する ATP 加水分解を促進し、ABCB1 の基質結合部位に結合する [¹²⁵I]IAAP (iodoarylazidoprazosin: ヨードアリアルアジドプラゾシン) の働きを阻害した。また、イソキノリン 2 を KB-V1 に継続投与しても細胞株での ABCB1 の発現は低下しなかった。以上より、イソキノリン 2 は直接的に ABCB1 の基質結合部位に働き、ABCB1 のモジュレーターとして働いていると考えられた。さらに、本研究では動物実験を行い、イソキノリン 2 をパクリタキセルと共に投与することで、KB-V1 を用いた皮下腫瘍モデルにおいてパクリタキセルの感受性は増強した。また、イソキノリン 2 投与による体重減少は見られなかった。以上より、イソキノリン 2 は抗がん剤の感受性を増強させる強力な新規 ABCB1 モジュレーターと考えられ

(書式12)

た。今後、イソキノリン**2**をリード化合物として、より安全で有効な ABCB1 モジュレーターの開発にもつながると期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 抗がん剤耐性 ABC トランスポーターに対する新規モジュレーターの同定と抗がん剤感受性への影響

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 消化器外科学 分野

学籍番号 B4MD5082 氏名 杉沢 徳彦

本研究では、東北大学薬学研究科が管理する化合物ライブラリーを用いて、5861 種類の化合物の中から抗がん剤耐性 ABC トランスポーターのひとつで代表的な ABCB1 に対する、新規モジュレーターの同定に成功している。ハイスループットスクリーニングの手法は様々報告されているが、設備や費用、時間の制約があり、より簡便な手法が望まれる。今回はまず、感度は低いが簡便に行えるマイクロプレートリーダーによる解析を行い、化合物の絞り込みを行っている。そして、フローサイトメトリーを用いた解析を追加して、最も効果の高い ABCB1 モジュレーターを同定することが出来ており、有用なスクリーニング手法であったと考える。

続いて、細胞毒性試験を行い、新規の ABCB1 モジュレーターであるイソキノリン **2** が、実際に抗がん剤の感受性を増強させることを確認している。ABCB1 の基質として知られる抗がん剤を複数用いて検討しており、効果の大小はあるが、イソキノリン **2** との併用でいずれの抗がん剤の感受性も増強している。また、このイソキノリン **2** と類似の構造を持つ既報の ABCB1 モジュレーターを合成してその効果を比較しており、イソキノリン **2** の持つ ABCB1 阻害効果が特に強いことを示している。さらに、生化学的機能解析も行い、イソキノリン **2** の作用機序についても検討している。ATP 加水分解試験、 $[^{125}\text{I}]$ IAAP による ABCB1 の放射標識試験の結果から、イソキノリン **2** は ABCB1 の基質結合部位に競合的に働くことで、阻害効果を示す化合物と考えられる。以上の *in vitro* の実験で、新規 ABCB1 モジュレーターとしての効果を十分に示した上で、さらに動物実験を行っており、*in vivo* でもイソキノリン **2** が ABCB1 モジュレーターとしてパクリタキセルの感受性を増強させることを示している。今後の臨床応用に向けて非常に意義のある研究結果と考える。

考察でも述べているように、イソキノリン **2** が ABCC1 や ABCG2 にも作用している可能性や、臨床応用する上で ABCB1 をバイオマーカーとすることは可能かなど今後検討すべき課題もあるが、イソキノリン **2** の同定から ABCB1 モジュレーターとしての効果の検証まで十分に実験を行っており、学位論文に値すると考える。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。